

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 8 月 18 日 (18.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/075640 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/47, C12N 5/10
(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/001880
(22) 国際出願日: 2005 年 2 月 9 日 (09.02.2005)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2004-033810 2004 年 2 月 10 日 (10.02.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人
日本大学 (NIHON UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1028275
東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加納 壘 (KANO,
Rui) [JP/JP]; 〒1028275 東京都千代田区九段南四丁目
8 番 2 4 号 学校法人日本大学内 Tokyo (JP). 長谷川
篤彦 (HASEGAWA, Atsuhiko) [JP/JP]; 〒1028275 東京
都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人日本
大学内 Tokyo (JP). 井上 知香 (INOUE, Chika) [JP/JP];
〒2270048 神奈川県横浜市青葉区柿の木台 2 7-1 1
Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 藤野 清也, 外 (FUJINO, Seiya et al.); 〒
1050001 東京都港区虎ノ門 2 丁目 7 番 7 号 虎ノ門
中田ビル 4 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CANINE CD20 GENE

(54) 発明の名称: イヌ CD 20 遺伝子

(57) Abstract: It is intended to clarify the CD20 amino acid sequence and its gene sequence which are essentially required in constructing an anti-CD20 antibody useful in treating animal malignant lymphoma. It is also intended to provide a method of diagnosing canine malignant lymphoma by using the CD20 gene sequence. Using monocytes in canine blood as a sample, mRNA is obtained and the full base sequence of canine CD20 gene (SEQ ID NO:2) is determined. Based on this sequence, its amino acid sequence (SEQ ID NO:1) is determined. Comparing the homologies with human and mouse CD20 genes and amino acid sequences, it is identified as canine CD20 gene. Moreover, a primer specific to the canine CD20 gene is constructed and the expression of the CD20 gene in a sample is examined, thereby giving a method of diagnosing canine B lymphocyte-origin malignant lymphoma.

(57) 要約: 本発明は、動物の悪性リンパ腫の治療に有用な抗CD20抗体の作成において、必須であるCD20アミノ酸配列および遺伝子配列を明らかにすることを課題とする。さらに、CD20遺伝子配列を用いて、イヌの悪性リンパ腫を診断する方法を提供することを課題とする。イヌの血液中の単核球を試料としてmRNAを得て、イヌCD20遺伝子全塩基配列 (配列番号2) を決定した。その配列に基づき、アミノ酸配列 (配列番号1) を決定した。ヒト、マウスのCD20遺伝子およびアミノ酸配列と相同性を比較し、イヌCD20遺伝子として同定した。さらに、イヌのCD20遺伝子に特異的なプライマーを作成し、試料におけるCD20遺伝子の発現を調べることで、イヌのBリンパ球由来の悪性リンパ腫を診断する方法を得た。

WO 2005/075640 A1

明 細 書

イヌCD20遺伝子

技術分野

[0001] 本発明は、悪性リンパ腫の抗体治療や診断等の開発に用いるイヌのCD20遺伝子に関する。

さらに、イヌのCD20遺伝子を増幅することで、イヌのCD20の発現を調べ、イヌのBリンパ球由来の悪性リンパ腫を診断する方法に関する。

背景技術

[0002] 悪性リンパ腫とは、生体内のリンパ組織が腫瘍化したものを言う。人間の悪性リンパ腫は、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に分けられ、非ホジキンリンパ腫はその由来によって、Tリンパ球由来、NK細胞由来やBリンパ球由来のリンパ腫がある。これらは、悪性化の進行の度合いに応じて、低悪性度リンパ腫、中悪性度リンパ腫、高悪性度リンパ腫に分けられる。

日本人では、悪性リンパ腫患者の大半が非ホジキンリンパ腫である。これはリンパ節に発生することが多いが、皮膚、脳、眼、鼻腔、副鼻腔、扁桃、咽頭、唾液腺、甲状腺、乳腺、肺、縦隔、胸膜、胃、小腸、大腸、肝臓、脾臓、精巣、卵巣、骨など、リンパ組織が存在する全身に発生し、組織ごとに症状が異なる。

[0003] 悪性リンパ腫は、イヌ等に多く認められる腫瘍の一つで、イヌにおいては体中のリンパ節が腫れる多中心型リンパ腫が多い。多中心型リンパ腫が悪性化すると、リンパ組織を介して肺や肝臓、脾臓、骨髄に転移し、黄疸や貧血などの症状を示す。

また、胸腺のリンパ節が腫れて胸腔内に水が溜まる胸腺型リンパ腫や、消化器のリンパ組織が腫瘍化する消化器型リンパ腫などもある。これらの悪性リンパ腫は進行が早く、イヌ等の罹患動物において、無治療の場合であると、発見後平均して100日前後で死に至る。従って、早期の発見とともに、発見後の適切な治療が望まれている。

[0004] 悪性リンパ腫の治療法として、放射線療法、化学療法、外科療法などの複数の治療法があるが、従来は、放射線療法と化学療法が主体的に行われている。

放射線療法は悪性リンパ腫の病変部位が数箇所である場合に多く用いられる。腫

瘍細胞に対し放射線を照射して、病変部位をピンポイントに死滅させる治療法であり、早期の腫瘍除去には最適な治療法であるが、皮膚障害や粘膜障害、肺障害の副作用がある。

- [0005] 化学療法はリンパ組織や臓器、骨髄や血液などの全身に腫瘍細胞が広がっている場合に多く用いられる。腫瘍細胞に対し細胞毒性を有する抗がん剤を投与して、全身の病変部位を死滅させる治療法であり、悪性リンパ腫における唯一の全身療法である。

人間の悪性リンパ腫において、シクロホスファミド、アドリアマイシン、ビンクリスチン、プレドニゾロンの抗がん剤を組み合わせ用いたCHOP(チョップ)療法が標準的になされる。また、イヌの悪性リンパ腫において、シクロホスファミド、ビンクリスチン、シトシンアラビノシド、プレドニゾロンの抗がん剤を組み合わせ用いたCOAP計画等がなされる(非特許文献1)。

- [0006] これらの抗がん剤は、すべての細胞を破壊する細胞毒であり、正常細胞にも影響を及ぼすが、腫瘍細胞が正常細胞より成長が早い為、腫瘍細胞の方が障害を受けやすいという性質を利用して用いられている。

しかし、これらの抗がん剤は、細胞分裂が早い正常細胞、例えば血液細胞、毛根細胞、消化管の細胞、生殖細胞などに対して、腫瘍細胞と同様に傷害してしまうため、白血球の減少、脱毛、吐き気などの副作用が起こる。

- [0007] 放射線療法、化学療法等は現在、主として行われている治療法であるにもかかわらず、生体内に及ぼす副作用が強く、また治療によっていったん寛解しても再発することが多々あるため、必ずしも完治できる治療法とはいえない。

また、治療法の実施には多額の費用が必要となる。人間のみならず、イヌ(30〜32kg)の治療においても米国の統計では、約1,500〜1,800ドルの費用がかかり、必ずしも安価とはいえない。そこで、このような問題を解決するために、安全性が高く、完治につながり、かつ安価に実施できる悪性リンパ腫の治療法が求められている。

- [0008] 化学療法は、使用する抗がん剤がすべての細胞を攻撃する細胞毒である点に問題があるといえる。そこで、標的となる腫瘍細胞のみを特異的に攻撃できる、モノクローナル抗体療法が近年注目されている(非特許文献2)。

これは、標的となる腫瘍細胞に特異的に発現する抗原を利用し、その抗原に特異的な抗体を用いて腫瘍細胞を特定することで、腫瘍細胞に集中的に薬剤が集まるようにする治療法である。

人間の悪性リンパ腫におけるこの治療法の対象として、Bリンパ球の細胞表面に特異的に発現し、悪性リンパ腫に高レベルで発現するCD20抗原を利用し、これを特異的に認識する抗CD20抗体を用いる方法があげられた。

[0009] 抗CD20抗体は、腫瘍細胞のCD20抗原と結合すると、抗体や補体を介する免疫反応が起こり、腫瘍細胞を傷害する。従来の抗がん剤とは作用機序が異なり、標的となる腫瘍細胞のみに働くため、細胞表面にCD20抗原が発現しない造血幹細胞等に影響を与えない。実際、副作用は過敏症、アレルギー症状と類似した病状のみで、抗がん剤のような、脱毛、吐き気などはほとんど起こらないことがわかっている。

抗CD20抗体は、ヒト由来のマウス／ヒトキメラ型抗体として、調整され、CD20陽性の低悪性度、または濾胞型B細胞性非ホジキンリンパ腫に対し、2001年に日本において保険適応となった。商品名リツキササン(rituxan)、一般名リツキシマブ(rituximab)という薬で全薬工業が販売している。

このように治療効果が優れ、副作用の少ない抗体療法は、悪性リンパ腫の治療法を大きく変えるものとして期待されている。

[0010] 人間において、このように有用な治療法が確立されたにもかかわらず、イヌ等の罹患動物において、抗体療法はいまだ行われていない。一方で、悪性リンパ腫の罹患動物は多く、抗体療法の確立が強く望まれている。そこで、本発明者らは抗体療法の確立において必須とされるイヌのCD20遺伝子配列を本発明にて明らかにした。本発明で明らかにしたイヌのCD20遺伝子配列はイヌの抗CD20抗体の作成に必須であり、イヌの悪性リンパ腫の抗体治療や診断等の開発に用いる。

さらに、本発明において明らかにしたイヌのCD20遺伝子配列を用い、イヌのCD20遺伝子の特異的に増幅できるプライマーを作成し、イヌのCD20の発現を調べることでイヌの悪性リンパ腫の診断に用いる。

非特許文献1:猫と犬のリンパ腫 長谷川篤彦 辻本元 総監訳 スモールアニマル
インターナルメディシン、1127-1137

非特許文献2:造血幹細胞移植の適応ガイドライン 日本造血細胞移植学会2002.4

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0011] 本発明は、イヌの抗CD20抗体の作成に必須であるイヌのCD20遺伝子配列を明らかにすることを課題とする。さらに、本発明は、明らかにしたイヌのCD20遺伝子配列より、イヌのCD20遺伝子の特異的に増幅できるプライマーを作成し、イヌのCD20遺伝子の発現を調べることで、イヌの悪性リンパ腫を診断する方法の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは、上記課題を鋭意検討した結果、イヌの血液中の単核球を試料として遺伝子を単離し、イヌのCD20遺伝子を精製し、この配列を明らかにすることができた。当該イヌのCD20遺伝子はヒトのCD20遺伝子と81.0%の高い相同性を有し、またマウスのCD20遺伝子とも71.8%の相同性を有することが明らかにされた。また、これらの遺伝子配列によってコードされるCD20のアミノ酸配列は、ヒトのCD20のアミノ酸配列と72.8%の高い相同性を有し、マウスのCD20のアミノ酸配列とも68.2%の相同性を有することが明らかにされた。

また、CD20は細胞の膜外に発現し、抗原として認識されることから、本発明にて解明されたCD20の膜外領域のアミノ酸配列とヒトCD20の膜外領域のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、66.6%であった。これらから当該イヌのCD20遺伝子は抗CD20抗体作成に有用であることが示唆された。

従って、本発明によって明らかにされたアミノ酸配列、DNA配列、RNA配列と70%以上または80%以上の相同性をもつ配列も有効と考えられ、この範囲内であれば、1またはそれ以上のアミノ酸または塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入されているものも含まれる。

さらに、本発明で明らかとされたイヌのCD20遺伝子配列より、イヌのCD20遺伝子の特異的に増幅できるプライマーを作成し、試料におけるイヌのCD20遺伝子を増幅することで、イヌのCD20遺伝子の発現を調べられることを見出し、イヌの悪性リンパ腫を診断する方法を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は、

- (1) 配列表配列番号1記載のアミノ酸配列を有するイヌCD20蛋白質、
 - (2) 配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列に70%以上の相同性を有する蛋白質、
 - (3) 配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列に80%以上の相同性を有する蛋白質、
 - (4) 配列表配列番号2記載のイヌCD20をコードするDNA、
 - (5) 配列表配列番号2に記載のDNA配列に70%以上の相同性を有するヌクレオチド、
 - (6) 配列表配列番号2に記載のDNA配列に80%以上の相同性を有するヌクレオチド、
 - (7) 配列表配列番号3記載のイヌCD20をコードするRNA、
 - (8) 配列表配列番号3に記載のRNA配列に70%以上の相同性を有するヌクレオチド、
 - (9) 配列表配列番号3に記載のRNA配列に80%以上の相同性を有するヌクレオチド、
 - (10) (4)に記載のイヌCD20遺伝子断片を組み込んだプラスミド、
 - (11) (5)または(6)に記載のヌクレオチドを組み込んだプラスミド、
 - (12) (7)に記載のイヌCD20遺伝子断片を組み込んだプラスミド、
 - (13) (8)または(9)に記載のヌクレオチドを組み込んだプラスミド、
 - (14) (10)または(11)に記載のプラスミドを組み込んだ形質転換体、
 - (15) (12)または(13)に記載のプラスミドを組み込んだ形質転換体、
 - (16) イヌCD20遺伝子またはその断片を増幅するための、配列表配列番号19に記載のプライマー、
 - (17) イヌCD20遺伝子またはその断片を増幅するための、配列表配列番号20に記載のプライマー、
 - (18) (16)または(17)に記載のプライマーを用い、イヌCD20遺伝子またはその断片を増幅することで、イヌのCD20遺伝子の発現を調べ、イヌの悪性リンパ腫を診断する方法、
- に関する。

発明の効果

[0014] 本発明により明らかにされたイヌのCD20遺伝子配列は、イヌの抗CD20抗体作成に必須である。本発明のイヌのCD20遺伝子配列は、イヌの悪性リンパ腫の抗体治療や診断等の開発に用いる。さらに、本発明で明らかとされたイヌのCD20遺伝子配列よ

り、イヌのCD20遺伝子の特異的に増幅できるプライマーを作成し、試料におけるイヌのCD20遺伝子を増幅し、イヌのCD20遺伝子の発現を調べることで、イヌの悪性リンパ腫を診断することができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]各試料におけるイヌCD20遺伝子の発現を示した図である。(実施例8) 図中のMはマーカーを示し、1～10は表1の試料1～10に対応する。11、12は正常イヌリンパ節由来の試料である。

発明を実施するための最良の形態

[0016] 本発明の目的であるCD20遺伝子配列の決定において、PCR法を用いるにあたり、試料の精度と使用するプライマーの設計が重要となる。mRNAの抽出などには市販のキットを用いることもできる。

[0017] さらに、本発明で明らかとされたイヌのCD20遺伝子配列より、イヌのCD20遺伝子またはその断片を特異的に増幅できるプライマーを作成する場合、作成するプライマーはイヌのCD20遺伝子またはその断片の発現を調べることができる遺伝子であれば、DNAでもRNAでもいずれでもよく、特にmRNAから合成したcDNAが扱いやすく好ましい。発現を調べるイヌのCD20遺伝子の断片としては、イヌのCD20の膜外領域の遺伝子を含む配列であることが好ましい。

以下に、本発明を具現化した実施例を示すが、本発明はいかなる場合でもこのような実施例に限定して解釈されるものではない。

実施例 1

[0018] <試料の調製>

(1) 単核球の分離

正常イヌ1頭より採取した血液(5ml)をヘパリンで抗凝固処理し、それにヘパリン加生理食塩水(5ml)を加え、転倒混和した(総量10ml)。遠心沈殿管に5mlのLymphoprepを入れ、その上に試料を重層し、遠心分離機にて室温で $800 \times g$ で遠心することで単核球を分離した。単核球の分離にはLymphoprep(Axis-Shield Pos AS)を用いた。

(2) RNA抽出

得られた単核球に、グアニジン塩を含んだBuffer RLT (β -メルカプトエタノール加)を加え細胞溶解させた。QIAshredderスピncラムに添加した後、 $1000 \times g$ で2分間遠心し、ホモジナイズした(QIAshredder、QIAGEN)。70%エタノールを添加しピペッティングした後、RNeasyミニスピncラムにアプライし、 $8000 \times g$ で15秒遠心した後、フロースルーを捨てた。RNAはRNeasyミニスピncラムのシリカゲルメンブレンに吸着した。

次にBuffer RW1をRNeasyカラムに添加し、5分間室温でインキュベートした後 $8000 \times g$ で15秒遠心し、フロースルーを捨てた。RNeasyカラムへBuffer RPEをアプライした後、 $8000 \times g$ で15秒遠心した。これを2回繰り返すことで不純物を取り除いた。

最後にRNase free waterを適量加え、 $8000 \times g$ で1分遠心することでRNAを溶出させた。RNAの抽出にはキット(RNeasy Mini Kit、QIAGEN)を用いた。

[0019] (3) DNase処理

得られたRNAに微量のゲノムDNAが混入することを避けるため、次のDNase処理によりゲノムDNAを取り除いた。

キットに付属のBufferとDNaseIをRNA溶液に加え、 37°C で30分間インキュベートした。DNase Inactivation Reagentをさらに混ぜあわせ、室温で2分間インキュベートした。 $8000 \times g$ で1分遠心し、上清を新しいチューブに移し、DNA-FreeのRNA溶液とした。DNase処理にはキット(DNA-free, Ambion)を用いた。

(4) cDNA合成

DNase処理したRNA溶液に、 $10 \times$ Buffer RT、dNTP Mix、RT(逆転写酵素)、Ribonuclease Inhibitor cloned (Invitrogen)、配列表配列番号6に示した配列を有するoligo dT primer(プロリゴ・ジャパン)を加え 37°C で1時間インキュベートすることでcDNAを合成した。cDNAの合成にはキット(Omniscript, QIAGEN)を用いた。

実施例 2

[0020] <イヌCD20遺伝子断片のクローニング>

(1) PCR

ヒト・マウスのCD20遺伝子の塩基配列を基に相同性の高い領域から配列表配列番号7に示した配列を有するSense primer及び配列表配列番号8に示した配列を有す

るReverse primerを設計し、合成したcDNAを鋳型としてPCRを行った(TaKaRa Taq、TaKaRa)。

キット中の耐熱性DNA polymerase (rTaq)を添加した反応液を94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、53〜60℃・1分、72℃・2分を35cycleの条件でPCRを行い、CD20遺伝子断片を増幅した。その後PCR産物をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

(2) TA cloning・Transformation

このCD20遺伝子断片をプラスミドベクター(pCR vector)に組み込み、大腸菌に形質転換した後(TA Cloning Kit、Invitrogen)、アンピシリン・X-gal添加LB培地にて大腸菌を増殖させた。

増殖した大腸菌が目的の遺伝子断片を含むプラスミドDNAを持っているか、ボイル法を用いて確認した。大腸菌からのプラスミド抽出にはキット(BioRad plasmid kit, BioRad)を用いた。

実施例 3

[0021] <イヌCD20遺伝子断片の塩基配列の決定>

シークエンス

得られたプラスミドを鋳型とし、使用したpCR vectorに特異的な配列配列番号9に示した配列を有するM13 Forward(-21)primer primer及び配列表配列番号10に示した配列を有するM13 Reverse primerを用いてサイクルシークエンス反応を行った。反応にはサーマルサイクラーを用い、96℃・10秒、50℃・5秒、60℃・4分を25cycle繰り返した。反応液の調製にはキット(Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems)を用いた。キット中のTerminator Ready Reaction MixにはDNA polymeraseの他、蛍光色素で標識されたジデオキシリボヌクレオシド3リン酸(ddNTP)があらかじめ混合されているものを用いた。

反応終了後のシークエンス産物をEthanol/EDTA沈殿法にて精製し、未反応の蛍光物質を除去した。これをTemplate Suppression Reagent (TSR)に溶解し、シークエンサー(ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)にて塩基配列を解析した。

実施例 4

[0022] <全イヌCD20遺伝子塩基配列の決定>

CD20遺伝子cDNAの全長を解析するため、一部解析した塩基配列より新たな primer を設計し、5'-および3'-RACE PCR (5'RACE System of Rapid Amplification of cDNA Ends version 2.0/3'RACE System of Rapid Amplification of cDNA Ends、Invitrogen) を行った。

(1) 3'RACE法

1) cDNA合成

RNA溶液に配列表配列番号11に示した配列を有するAdaptor Primerを混合し、70℃で10分インキュベートした。氷上に3分付けた後、Buffer・0.1M DTT・10mM dNTPを加えて混合し、37℃で2分加温した。次に逆転写酵素 (SuperScript II Reverse Transcriptase) を加えて混合し、42℃で1時間反応させ、cDNAを合成した。

2) PCR

配列表配列番号12に示した配列を有するSense primer (GSP1) および配列表配列番号13に示した配列を有するReverse primer (Universal Amplification Primer: キット中) を用い、耐熱性DNA polymerase (rTaq) を添加した反応液を94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、54℃・1分、72℃・2分を35cycleの条件でFirst PCRを行った。次にFirst PCR産物をtemplateにした反応液を調製し、配列表配列番号14に示した配列を有するSense primer (GSP2) および配列表配列番号13に示した配列を有するReverse primer (Universal Amplification Primer : キット中) を用い、94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、55℃・1分、72℃・2分を35cycleの条件でnested PCR (Second PCR) を行うことで、CD20遺伝子断片を増幅した。

rTaq (TaKaRa Taq、TaKaRa) 以外の試薬は3'RACE法のキット中のものを使用した。その後PCR産物をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

[0023] (2) 5'RACE法

1) cDNA合成

RNA溶液に配列表配列番号15に示した配列を有するSense primer (GSP1) を加え、70℃で10分インキュベートした。氷上に1分置いた後、Buffer、MgCl₂、DTT、dNTP、

逆転写酵素(SuperScript II Reverse Transcriptase)を加え、42℃で1時間インキュベートした。70℃で15分加温しReverse Transcriptaseを失活させた。RNase Mixを加え、37℃で30分加温することでRNAを分解した。

2) DNA精製

cDNA反応液にbinding solutionを加え混合し、spin cartridgeに移す。1000×gで2分間遠心し、フロースルーを捨てた。Wash Bufferを加え、1000×g2分間遠心しフロースルーを捨てた。spin cartridgeを新しいチューブに移し、65℃の滅菌水を加え1分間室温でインキュベートした後、14000rpmで1分間遠心し、液を回収した。

[0024] 3) TdTによるホモポリマーの付加

滅菌水 7.5、Buffer、MgCl₂、dCTP、cDNAを混ぜ、94℃で1〜2分加温し、氷上で1分おき、TdTを加え、37℃で10分、65℃で10分インキュベートした。

4) PCR

配列表配列番号16に示した配列を有するSense primer (GSP2) および配列表配列番号17に示した配列を有するReverse primer (Anchor Primer :キット中)を用い、耐熱性DNA polymerase (rTaq) を添加した反応液を94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、50℃・1分、72℃・2分を35cycleの条件でFirst PCRを行った。次にFirst PCR産物をtemplateにした反応液を調整し、配列表配列番号18に示した配列を有するSense primer (GSP3) および配列表配列番号13に示した配列を有するReverse primer (Universal Amplification Primer:キット中)を用い、94℃で5分heat denateした後、94℃・1分、58℃・1分、72℃・2分を35cycleの条件でnested PCR(Second PCR)を行うことで、CD20遺伝子断片を増幅した。rTaq (TaKaRa Taq、TaKaRa)以外の試薬の調整は3'RACE法のキット中のものを使用した。その後PCR産物をアガロースゲル電気泳動にて確認した。

実施例 5

[0025] <イヌCD20遺伝子の同定法について>

解析した遺伝子の塩基配列と、ヒト・マウスの遺伝子との相同性を確認した。Genbankに登録されているヒトCD20ゲノム(エキソン)との相同性が81.0%、マウスCD20mRNAとは71.8%と高い相同性を示したため、今回解析した遺伝子はイヌの

CD20であると判断できた。イヌのCD20のDNA配列は配列表配列番号3に示し、イヌのCD20のRNA配列は配列表配列番号4に示した。

実施例 6

[0026] <アミノ酸配列の同定方法について>

解析した遺伝子の塩基配列より、CD20のアミノ酸配列を同定した。同定したイヌのCD20アミノ酸配列は配列表配列番号1に示した。

このアミノ酸配列とヒト・マウスの遺伝子との相同性を確認した。Genbankに登録されているヒトCD20のアミノ酸配列との相同性が72.8%、マウスでは68.2%と高い相同性を示したため、今回解析した遺伝子はイヌのCD20であると判断できた。

またヒトCD20の膜外領域のアミノ酸配列とそれに相当すると考えられるイヌCD20のアミノ酸配列の相同性は66.6%であった。CD20の膜外領域の配列は配列表配列番号2に示し、DNA配列は配列表配列番号5に示した。

実施例 7

[0027] <イヌCD20遺伝子を増幅するためのプライマーの作製>

上記において決定した全イヌCD20遺伝子塩基配列より、配列表配列番号5に記載のイヌCD20の膜外領域の遺伝子を含む506bpの配列を増幅するためのプライマーとして適した配列を選択し、配列表配列番号19に示した配列を有するSense primerおよび配列表配列番号20に示した配列を有するReverse primerを設計した。

実施例 8

[0028] <イヌの悪性リンパ腫を診断する方法>

(1) 試料の調製

正常イヌリンパ節(2例)およびリンパ腫(Stage III 1例、IV 1例、V 8例)のリンパ節から採取した腫瘍細胞から、キット(Rneasy Mini kit、QIAGEN)を用いて、total RNAを抽出した。次に混入しているDNAをキット(DNA free kit、Ambion)で取り除いた後、total RNA(2 μ g)からキット(Omniscrypt RT kit、QIAGEN)を用いて、PCR反応に使用する鋳型cDNAを合成した。なお、リンパ腫(10例)における各試料の由来は表面抗原解析によって調べ、各試料の由来および特徴を表1に示した。

各試料の鋳型cDNA量をそろえるために、遺伝子発現の対照遺伝子としてイヌの

GAPDH遺伝子量の発現量を調べ、これに基づき各試料中のcDNA量を均一化した。各試料におけるイヌのGAPDH遺伝子について、GAPDH遺伝子特異的プライマー (Sense primer 5'-CTCTTTGCTGCCATTTCTGGAAT-3', Reverse primer 5'-TCTATTGGTGAAGATTCCTG-3') と、耐熱性DNA polymerase (rTaq) を添加した反応液を94℃で5分heat denateした後、94℃・30秒、55℃・30秒、72℃・1分 (伸長反応7分) を26cycleの条件でPCRを行った (TaKaRa Taq, TaKaRa)。PCR反応によって増幅した遺伝子を2%のアガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウムで染色後、紫外線照射下で観察した。

[0029] [表1]

No.	犬種および年齢	解剖学的分類	細胞表面抗原	Stage	治療経過
1	ゴールデン・レトリバー、7歳	多中心型	B cell	V b	2回再発し斃死
2	シーズー、13歳	多中心型	B cell	V b	2回再発し斃死
3	マルチーズ、6歳	多中心型	B cell	V a	不明
4	ゴールデン・レトリバー、10歳	多中心型	T cell	V b	抗癌剤耐性
5	シベリアンハスキー、11歳	多中心型	不明	III b	3回再発
6	ゴールデン・レトリバー、7歳	多中心型	B cell	V b	3回再発し斃死
7	ラブラドル・レトリバー、3歳	縦隔型	nonB nonT cell	V b	第3病日斃死
8	ゴールデン・レトリバー、4歳	多中心型	B cell	V b	2回再発し斃死
9	犬種不明、7歳	多中心型	B cell	IV a	不明
10	ゴールデン・レトリバー、8歳	多中心型	B cell	V a	不明

[0030] (2) 試料の増幅

各試料のcDNA量を均一化し、それらを鋳型として、配列表配列番号19に示した配列を有するCD20遺伝子またはその断片を増幅するためのSense primerおよび配列表配列番号20に示した配列を有するCD20遺伝子またはその断片を増幅するためのReverse primerと、耐熱性DNA polymerase (rTaq) を添加した反応液を94℃で5分heat denateした後、94℃・30秒、55℃・30秒、72℃・1分 (伸長反応7分) を37cycleの条件でPCRを行った (TaKaRa Taq, TaKaRa)。PCR反応によって増幅された各試料のcDNAについてアガロースゲル上で電気泳動し、臭化エチジウムで染色後、紫外線照射下で観察した。これに基づき各試料におけるイヌCD20の膜外領域の遺伝子を含む断片の増幅の有無により、イヌCD20遺伝子の発現を調べ、イヌのBリンパ球由

来の悪性リンパ腫の診断に用いた。各試料におけるイヌCD20遺伝子の発現を図1に示した。

[0031] (3) 結果

図1に示したように、正常イヌリンパ節2例(図1、11、12)およびBリンパ球由来7例(図1、12の1〜3、6、8〜10)においては、CD20遺伝子の発現が認められたが、Tリンパ球由来1例(図1、4)、未分化リンパ腫細胞1例(図1、7)、不明1例(図1、5)においてはCD20遺伝子の発現が認められなかった。このことより、本発明の配列表配列番号19及び20に記載のCD20遺伝子を増幅するためのプライマーを用い、CD20遺伝子の発現を調べることで、イヌのBリンパ球由来の悪性リンパ腫を診断できることが示された。

産業上の利用可能性

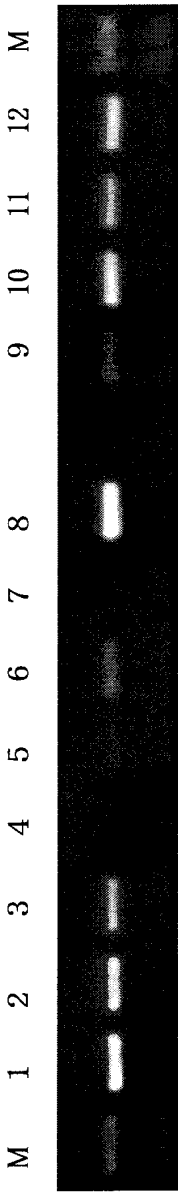
[0032] 本発明により明らかにされたイヌのCD20遺伝子配列は、イヌの悪性リンパ腫の抗体治療や診断等の開発において有用である。さらに詳しくは該遺伝子配列よりイヌの抗CD20抗体作成し、新規なイヌの悪性リンパ腫の治療薬や診断薬、またはそれらを用いる器具等の開発に役立つ。

請求の範囲

- [1] 配列表配列番号1記載のアミノ酸配列を有するイヌCD20蛋白質。
 - [2] 配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列に70%以上の相同性を有する蛋白質。
 - [3] 配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列に80%以上の相同性を有する蛋白質。
 - [4] 配列表配列番号2記載のイヌCD20をコードするDNA。
 - [5] 配列表配列番号2に記載のDNA配列に70%以上の相同性を有するヌクレオチド。
 - [6] 配列表配列番号2に記載のDNA配列に80%以上の相同性を有するヌクレオチド。
 - [7] 配列表配列番号3記載のイヌCD20をコードするRNA。
 - [8] 配列表配列番号3に記載のRNA配列に70%以上の相同性を有するヌクレオチド。
 - [9] 配列表配列番号3に記載のRNA配列に80%以上の相同性を有するヌクレオチド。
 - [10] 請求項4に記載のイヌCD20遺伝子断片を組み込んだプラスミド。
 - [11] 請求項5または6に記載のヌクレオチドを組み込んだプラスミド。
 - [12] 請求項7に記載のイヌCD20遺伝子断片を組み込んだプラスミド。
 - [13] 請求項8または9に記載のヌクレオチドを組み込んだプラスミド。
 - [14] 請求項10または11に記載のプラスミドを組み込んだ形質転換体。
 - [15] 請求項12または13に記載のプラスミドを組み込んだ形質転換体。
 - [16] イヌCD20遺伝子またはその断片を増幅するための、配列表配列番号19に記載のプライマー。
 - [17] イヌCD20遺伝子またはその断片を増幅するための、配列表配列番号20に記載のプライマー。
 - [18] 請求項16または17に記載のプライマーを用い、イヌCD20遺伝子またはその断片を増幅することで、イヌのCD20遺伝子の発現を調べ、イヌの悪性リンパ腫を診断する方法。
- 。

[図1]

CD20 の発現 (37cycle)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001880

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/47, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/47, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	STAMENKOVIC I. and SEED B., Analysis of two cDNA clones encoding the B lymphocyte antigen CD20 (B1, Bp35), a type III integral membrane protein., J.Exp.Med., 1988, Vol.167, pages 1975 to 1980, full text	2, 3 1-4, 10, 16-18
X Y	THOMAS TF. et al., Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes., Proc.Natl. Acad.Sci.USA., 1988, Vol.85, pages 208 to 212, full text	2, 3 1-4, 10, 16-18
X Y	EP 330191 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.), 30 March, 1989 (30.03.89), Figs. 10A-1, 10A-2 & US 5506126 A	2, 3 1-4, 10, 16-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April, 2005 (14.04.05)

Date of mailing of the international search report

10 May, 2005 (10.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001880

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EINFELD DA. et al., Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains., EMBO J., 1988, Vol.7, No.3, pages 711 to 717, full text	2,3 1-4,10,16-18
X Y	THOMAS TF. et al., Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to chromosome B1(CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19., J.Immunol., 1988, Vol.141, No.12, pages 4388 to 4394, full text	2 1-4,10,16-18
Y	SAKASITA C., Cloning and characterization of the human BAZF gene, a homologue of the BCL6 oncogene., Biochem.Biophys.Res.Comm., 2002, Vol.291, pages 567 to 573	1-4,10,16-18
Y	Masami MURAMATSU, Masaharu SAKAI, "Life Science Series Idenshi Kumikae Jitsuyoka Gijutsu", 2nd series, Kabushiki Kaisha Science Forum, 1981, pages 31 to 34	1-4,10,16-18
X	WO 97/31012 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN), 28 August, 1997 (28.08.97), Page 10; table 1 & AU 1959897 A	16
X	Venta PJ. et al., Gene-specific universal mammalian sequence-tagged sites: application to the canine genome., Biochem.Genet., 1996, Vol.34, No.7/8, pages 321 to 341, page 338, Table AII	16
Y	WO 01/34194 A1 (IDEC PHARMACEUTICALS CORP.), 17 May, 2001 (17.05.01), Page 1 & US 01/18041 A1	18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001880

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 5-9, 11-15
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Although "the DNA sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing" is given in claims 5 and 6, no DNA sequence is represented by "SEQ ID NO:2 in Sequence Listing". Thus, the meanings of claims 5 and 6 are unclear and, therefore, no international search can be made (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/001880

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

on claims 5 and 6. Although "the RNA sequence represented by SEQ ID NO:3 in Sequence Listing" is given in claims 7 to 9, the sequence represented by "SEQ ID NO:3 in Sequence Listing" contains thymine and, therefore, cannot be considered as an RNA sequence. Thus, the meanings of claims 7 to 9 are unclear and, therefore, no international search can be made on claims 7 to 9. Similarly, no international search can be made on claims 11 to 15 depending on claims 5 to 7.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/47, C12N5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C07K14/47, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	STAMENKOVIC I. and SEED B., Analysis of two cDNA clones encoding the B lymphocyte antigen CD20 (B1, Bp35), a type III integral membrane protein., J. Exp. Med., 1988, Vol.167, p.1975-1980, 全文	2, 3 1-4, 10, 16-18
X Y	THOMAS TF. ET AL, Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, Vol.85, p.208-212, 全文	2, 3 1-4, 10, 16-18
X Y	EP 330191 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 1989.03.30, FIG.10A-1, FIG.10A-2 & US 5506126 A	2, 3 1-4, 10, 16-18
X Y	EINFELD DA. ET AL, Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains., EMBO J., 1988, Vol.7, No.3, p.711-717, 全文	2, 3 1-4, 10, 16-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.04.2005

国際調査報告の発送日

10.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

3534

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	THOMAS TF. ET AL, Cloning of a complementary DNA encoding a new mouse B lymphocyte differentiation antigen, homologous to chromosome B1 (CD20) antigen, and localization of the gene to chromosome 19., J. Immunol., 1988, Vol.141, No.12, p.4388-4394, 全文	2 1-4, 10, 16-18
Y	SAKASITA C., Cloning and characterization of the human BAZF gene, a homologue of the BCL6 oncogene., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, Vol.291, p.567-573	1-4, 10, 16-18
Y	村松正実/酒井正春, ライフサイエンスシリーズ 遺伝子組換え実用化技術 第2集, 株式会社サイエンスフォーラム, 1981, p.31-34	1-4, 10, 16-18
X	WO 97/31012 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 1997.08.28, p.10 Table I & AU 1959897 A	16
X	Venta PJ. ET AL, Gene-specific universal mammalian sequence-tagged sites: application to the canine genome., Biochem. Genet., 1996, Vol.34, No.7/8, p321-341, p.338 Table AII	16
Y	WO 01/34194 A1 (IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION) 2001.5.17, p.1 & US 01/18041 A1	18

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 5-9, 11-15 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲5及び6には「配列表配列番号2記載のDNA配列」とあるが、「配列表配列番号2」にはDNA配列が記載されていないから、請求の範囲5及び6に記載の内容が明らかでない。したがって、請求の範囲5及び6については、国際調査をすることができない。また、請求の範囲7-9には「配列表配列番号3記載のRNA配列」とあるが、「配列表配列番号3」記載のものにはチミンを含んでいるからRNA配列であるとはいえないので、請求の範囲7-9に記載の内容が明らかでない。したがって、請求の範囲7-9については、国際調査をすることができない。また、請求の範囲11-15は請求の範囲5-7を引用しているため同様に国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。